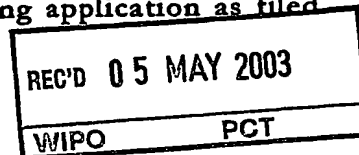


日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

05.03.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office



出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 3月 8日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-062963

[ST.10/C]:

[JP2002-062963]

出 願 人

Applicant(s):

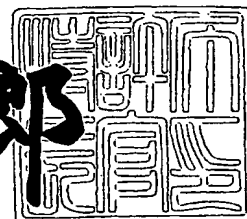
松下電器産業株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月15日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3026476

Best Available Copy

【書類名】 特許願

【整理番号】 2033740045

【提出日】 平成14年 3月 8日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 27/327

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府吹田市上山田 1 - 7 - 1 0 1 7

 【氏名】 桑畑 進

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式
会社内

 【氏名】 中南 貴裕

【特許出願人】

 【識別番号】 000005821

 【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100097445

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 岩橋 文雄

【選任した代理人】

 【識別番号】 100103355

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 坂口 智康

【選任した代理人】

 【識別番号】 100109667

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 内藤 浩樹

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 011305

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9809938

【書類名】 明細書

【発明の名称】 基質の定量方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 作用極及び対極を含む電極系、並びに酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系を用い、阻害物質が溶解した試料液中に含まれている基質を定量する方法であって、前記試薬系の存在下で、前記電極系に前記試料液を供給する工程 A、前記作用極に交流電位を印加し、前記電子伝達体の酸化還元反応を生じさせる工程 B、前記電子伝達体の酸化還元反応に基づいて生じた電気信号を前記電極系により測定する工程 C、及び前記電気信号に基づいて前記試料液中に含まれる基質を定量する工程 D を含むことを特徴とする基質の定量方法。

【請求項 2】 絶縁性の基板、前記基板上に配置された作用極及び対極を含む電極系、並びに酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系を備えたバイオセンサを用い、阻害物質が溶解した試料液中に含まれている基質を定量する方法であって、前記バイオセンサに前記試料液を供給する工程 A、前記作用極に交流電位を印加し、前記電子伝達体の酸化還元反応を生じさせる工程 B、前記電子伝達体の酸化還元反応に基づいて生じた電気信号を前記電極系により測定する工程 C、及び前記電気信号に基づいて前記試料液中に含まれる基質を定量する工程 D を含むことを特徴とする基質の定量方法。

【請求項 3】 絶縁性の第 1 の基板、絶縁性の第 2 の基板、前記第 1 の基板上に配置された作用極及び前記第 2 の基板上に配置された対極を含む電極系、並びに酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系を備えたバイオセンサを用い、阻害物質が溶解した試料液中に含まれている基質を定量する方法であって、前記バイオセンサに前記試料液を供給する工程 A、前記作用極に交流電位を印加し、前記電子伝達体の酸化還元反応を生じさせる工程 B、前記電子伝達体の酸化還元反応に基づいて生じた電気信号を前記電極系により測定する工程 C、及び前記電気信号に基づいて前記試料液中に含まれる基質を定量する工程 D を含むことを特徴とする基質の定量方法。

【請求項 4】 作用極に直流電位を印加する工程 E、及び前記工程 E において生じた電気信号を測定する工程 F をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 ～ 3

のいずれか 1 項に記載の基質の定量方法。

【請求項 5】 交流電位の中心電位が、電子伝達体の酸化還元電位に対して $-0.1 \sim +0.1$ V の範囲内であり、かつ阻害物質の作用極での反応が拡散律速領域となる電位領域の中で最も負の電位に対して 0.05 V 負の電位よりも正の電位であることを特徴とする、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の基質の定量方法。

【請求項 6】 電気信号がインピーダンスであることを特徴とする、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の基質の定量方法。

【請求項 7】 電極系がさらに参照極を含むことを特徴とする、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の基質の定量方法。

【請求項 8】 作用極が回転ディスク電極またはマイクロ電極であることを特徴とする、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の基質の定量方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、酸化還元酵素を用いて試料中に含まれる基質を電気化学的に定量する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

試料中に存在する特定の基質を簡易に測定及び定量するための方法が数多く開発されている。中でも、近年、酵素が有する基質選択的触媒作用を利用することによって、選択性良く測定及び定量する方法が注目を集めており、一部の方法は体液中の特定成分の定量を行う方法として、臨床検査の分野、さらには一般の人々による自己検査の分野において用いられている。

【0003】

試料中の基質を定量測定する方法の一例として、グルコースの電気化学的定量法について述べる。グルコースオキシダーゼ（以下、 GOx と略称する）はグルコースの酸化を選択的に触媒する酵素である。 GOx とグルコースを含む反応液中に一定量の酸化型の電子伝達体（反応によって生じた電子を酵素から電極へと

伝達する化合物)を存在させると、グルコースの酸化にともない、酸化型の電子伝達体が還元され、還元型の電子伝達体が生成する。生成した還元型の電子伝達体を、直流電位を印加した電極を用いて酸化して、流れる電流を測定する。このとき流れる電流は、GOxとグルコースとの反応により生成した還元型の電子伝達体の量に比例し、かつその還元型の電子伝達体の量はグルコースの含有量に比例するので、以上のような測定によってグルコースの定量が実現される(例えば、A. P. F. Turner et al, Biosensors, Fundamentals and Applications, Oxford University Press, 1987参照)。

【0004】

また、酵素と電子伝達体とともに電極上に乾燥担持し、バイオセンサ電極素子を作成することが可能である。このような技術に基づいた使い捨て型のグルコースセンサの開発は近年多くの注目を集めている。その代表的な例が、特許第2517153号公報に示されるバイオセンサである。使い捨て型のグルコースセンサにおいては、測定器に着脱可能に接続されたセンサ素子に試料液を導入するだけで容易にグルコース濃度を測定することができる。

【0005】

以上では、試料中に存在する特定の基質を簡易に測定及び定量するための方法について述べたが、基質定量法ではなく、一般的な電気化学測定法の一つとして、電極に直流電位ではなく交流電位を印加して、得られる電気信号を測定する方法(以下、交流法と呼ぶ)が存在する。主に電極/電解液界面の構造に関する情報を得るための方法であり、例えば二次電池の活物質担持電極の特性評価がこのような測定法を用いることによって行われている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

前述したように、酵素を用いることにより、基質選択性の比較的高い測定が実現されるが、これまでに用いられてきた直流電位を印加する電気化学的測定においては、試料中に含まれる測定対象となる基質以外の物質の影響によって測定誤差が引き起こされていた。例えば、血液を試料として電気化学測定を行う場合、

血液中に含まれるアスコルビン酸（ビタミンC）、尿酸、及びアセトアミノフェンなどの易酸化性の化合物が誤差を引き起こす原因となる。これらのような、直流電位を印加する測定において誤差を生む物質は阻害物質と呼ばれる。以下、従来の方法において、阻害物質による電流誤差が生じる理由を、図3を用いて説明する。図3は、GOx、電子伝達体、及びグルコースが溶解した溶液、並びに阻害物質の溶液において得られる、電極電位と電流の関係の例である。従来の方法によるグルコースの定量においては、通常、電子伝達体が十分酸化される電位E1を電極に印加することによって、電流が得られている。E1を電極に印加した場合、図3からも明らかなように、阻害物質の電極での電気化学的酸化も十分に進行する。この阻害物質の電気化学的酸化により流れる電流（I3）が、グルコースに対する電流（I1）に重畳するため、グルコースの測定に正誤差が生じる。仮に電子伝達体が、中程度に酸化されるような電位、例えば図3に示すE2を用いたとしても、阻害物質による電流は回避することができず、さらには阻害物質による電流が全電流内で占める割合が増え、S/N比が悪化してしまう。

【0007】

阻害物質が酸化されない電位E3よりも負な酸化還元電位を有する化合物を電子伝達体として用いると、原理的には誤差は生じないことになる。そのような化合物を用いたグルコースの定量を行う試みがいくつかなされている。しかしながら、この場合、GOxと該化合物との間の電位差が小さくなってしまうことにより、それらの間の電子移動速度が非常に遅くなる、あるいは全く起こらなくなる。その結果、グルコースの定量を行うための電流が検出可能なほどに大きくなり、あるいは電流を検出するために非常に長時間を有する、さらには電流を全く得ることができないという問題点があった。

【0008】

また、阻害物質の血中濃度は、各個人によって異なり、あるいは同一人物であっても、日々変化するので、生ずる測定誤差を予測し、これを補正することは従来の測定では非常に困難であった。

【0009】

阻害物質の影響を補正、あるいは除去するために様々な方策が試みられている

。例えば、米国特許第 6 3 4 0 4 2 8 号公報においては、作用極及び対極以外に、妨害物質測定用の第 3 の電極を設けることによって阻害物質の影響を補正する方法及びセンサが開示されている。酵素反応の進行、及びそれに続く作用極での基質の測定に先立って、試料中に含まれる妨害物質の測定を第 3 の電極にて行うことにより、良好な補正が実現されている。

【0010】

また、阻害物質の影響を除去するための方法としては、阻害物質の電極への拡散をブロックする膜を電極上に配置することによって、阻害物質による電流を抑制する方法及びセンサが開発されている。例えば、Wang, J. らは、Electroanalysis 1996, 8, 1127-1130. において、ポリ（オーフェニレンジアミン）膜の使用を開示している。

【0011】

このように、試料中に存在する特定の基質を測定及び定量するために用いる、従来の直流電位を使用した電気化学的方法において、阻害物質による影響の補正、あるいは除去を実現するためには、センサ素子あるいは電極の構成を複雑にすることが必要であった。

【0012】

そこで本発明は、上記従来の問題点に鑑み、簡易な構成の測定系により、阻害物質による測定誤差を生じることなく、試料液中に含まれる基質を正確に定量することができる方法を提供することを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】

上記の問題点を解決するために、本発明の基質の定量方法は、作用極及び対極を含む電極系、並びに酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系を用い、阻害物質が溶解した試料液中に含まれている基質を定量する方法であって、前記試薬系の存在下で、前記電極系に前記試料液を供給する工程 A、前記作用極に交流電位を印加し、前記電子伝達体の酸化還元反応を生じさせる工程 B、前記電子伝達体の酸化還元反応に基づいて生じた電気信号を前記電極系により測定する工程 C、及び前記電気信号に基づいて前記試料液中に含まれる基質を定量する工程 D を含

むことを特徴とする。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明の一実施の形態における基質の定量方法は、作用極及び対極を含む電極系、並びに酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系を用い、阻害物質が溶解した試料液中に含まれている基質を定量する方法であって、前記試薬系の存在下で、前記電極系に前記試料液を供給する工程A、前記作用極に交流電位を印加し、前記電子伝達体の酸化還元反応を生じさせる工程B、前記電子伝達体の酸化還元反応に基づいて生じた電気信号を前記電極系により測定する工程C、及び前記電気信号に基づいて前記試料液中に含まれる基質を定量する工程Dを含むことを特徴とする。

【0015】

このようにすると、阻害物質の影響を受けずに基質の測定を行うことが可能となる。その理由について以下に述べる。

【0016】

交流測定は、ある一定の直流電位を中心電位として、その中心電位に対して微小な振幅の交流電位成分を重畳させた交流電位を作用極に印加し、得られる電気信号を測定する測定法である。直流サイクリックボルタンメトリーと比較しながら交流測定について以下に説明する。

【0017】

まず、阻害物質が溶解していない試料液を用い、かつ上記の本実施の形態における基質の定量方法と同様の電極系と試薬系を用いた場合の直流サイクリックボルタンメトリーについて考える。この場合、電流（I）と電位（E）との間にはいわゆる触媒波が観測され、電位走査速度を速くした場合でも、電子伝達体由来するアノード（あるいはカソード）ピークを持たないシグモイド波形を、通常得ることができる。このシグモイド波形が得られるような系で、比較的遅い電位走査速度を用いて直流サイクリックボルタンメトリーを行うと、アノード波とカソード波の間のヒステリシスはほとんど観測されなくなる。したがって、この場合、電位変化に対する電流変化の割合（ dI/dE ）は、実質上オームの法則に

則り、系の抵抗成分（ R ）の逆数を示すこととなる。

【0018】

次に、同様の系で交流測定を行った場合を考える。上述したような、比較的遅い電位走査速度を用いた直流サイクリックボルタンメトリーにヒステリシスがほとんど存在しないことと同様に、比較的低い周波数を用いた交流測定においては、交流電流（ I_{ac} ）と交流電位（ E_{ac} ）との間には位相差がほとんど生じない。よって、このときの系の抵抗成分であるインピーダンス（ Z ）は $d I_{ac} / d E_{ac}$ に基づくものである。 Z を測定して、その実数要素を横軸に、負の虚数要素を縦軸にプロット（複素インピーダンスプロット）すると、上述したように比較的低い周波数においては電流－電位間に位相差がほとんどないので、プロットは実数軸付近に、ある大きさ $|Z_0|$ を有して存在することとなる。徐々に周波数を高くしていくと、系の容量成分の影響が出るため、 Z の大きさは減少し、そのプロット群は $|Z_0|$ を直径とする円弧でほぼ近似できる曲線を形成する。

【0019】

交流法における $d I_{ac} / d E_{ac}$ は、直流サイクリックボルタンメトリーと同様に、系に含まれる基質量の増加にともない増大する。ゆえに、複素インピーダンスプロットにおける $|Z_0|$ は基質量の増加にともない減少し、その結果、得られる円弧の直径の大きさが基質量の増加にともない減少する。したがって、交流法によって得られる電気信号を測定することにより、試料液中に含まれる基質の量を測定または定量することが可能である。ここで、作用極に印加する交流電位の中心電位を電子伝達体の酸化還元電位付近（例えば図3における E_2 付近）に設定すると、 $d I_{ac} / d E_{ac}$ が大きくなり、かつ基質の量の変化にともなう電気信号の変化量が大きくなるので好ましい。

【0020】

一方、阻害物質のみが含まれる電解液を用いた場合を考えると、阻害物質の電極での反応がほぼ拡散律速となる電位領域（例えば図3における $E_4 \sim E_1$ ）では、直流サイクリックボルタンメトリーにおける $d I / d E$ は実質的にほぼ無視できる大きさとなる。よって、交流測定においては、上記のような電位範囲に、作用極に印加する交流電位の中心電位がある場合、電位変調に対する阻害物質由

来の電流変化 ($d I_{ac} / d E_{ac}$) はほぼ実質的に無い。

【 0 0 2 1 】

電極における電気化学反応が複数並行して進行している場合、得られる電流は基本的に、各々の電気化学反応により流れる電流の単純な和となる。例えば、図 3 における二つの溶液組成を合わせた電解液においては、電位 E_1 を用いた場合、得られる電流は $I = I_1 + I_3$ になる。このように、電流と電位の関係、およびその関係から得られる R や Z に関する議論については、基質と阻害物質が混合している試料液を用い、かつ上記の本実施の形態における基質の定量方法と同様の電極系と試薬系を用いた場合においても、前述のような基質を含む電解液、あるいは阻害物質を単独に含む電解液における説明が、基質及び阻害物質に対してそれぞれ成り立ち、その結果、例えば、電位 E_2 付近における $d I_{ac} / d E_{ac}$ は、前述の基質を含み、阻害物質を含まない電解液で得られるそれと実質的にほぼ同じであり、阻害物質による $d I_{ac} / d E_{ac}$ への寄与はほぼ実質的に無い。

【 0 0 2 2 】

以上の理由により、本発明の一実施の形態における基質の定量方法によると、阻害物質の影響を受けずに基質の定量を行うことが可能となる。

【 0 0 2 3 】

本発明の他の実施の形態における基質の定量方法は、絶縁性の基板、前記基板上に配置された作用極及び対極を含む電極系、並びに酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系を備えたバイオセンサを用い、阻害物質が溶解した試料液中に含まれている基質を定量する方法であって、前記バイオセンサに前記試料液を供給する工程 A、前記作用極に交流電位を印加し、前記電子伝達体の酸化還元反応を生じさせる工程 B、前記電子伝達体の酸化還元反応に基づいて生じた電気信号を前記電極系により測定する工程 C、及び前記電気信号に基づいて前記試料液中に含まれる基質を定量する工程 D を含むことを特徴とする。このようにすると、より簡便な基質の定量が可能となる。

【 0 0 2 4 】

また、本発明のさらに他の実施の形態における基質の定量方法は、絶縁性の第 1 の基板、絶縁性の第 2 の基板、前記第 1 の基板上に配置された作用極及び前記

第2の基板上に配置された対極を含む電極系、並びに酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系を備えたバイオセンサを用い、阻害物質が溶解した試料液中に含まれている基質を定量する方法であって、前記バイオセンサに前記試料液を供給する工程A、前記作用極に交流電位を印加し、前記電子伝達体の酸化還元反応を生じさせる工程B、前記電子伝達体の酸化還元反応に基づいて生じた電気信号を前記電極系により測定する工程C、及び前記電気信号に基づいて前記試料液中に含まれる基質を定量する工程Dを含むことを特徴とする。

【0025】

ここで、作用極に直流電位を印加する工程E、及び前記工程Eにおいて生じた電気信号を測定する工程Fをさらに含むことが好ましい。このようにすると、工程Fにおいて測定される電気信号は基質及び阻害物質に関する情報を含むので、交流測定と組み合わせることにより、工程Cにおいて測定された電気信号及び工程Fにおいて測定された電気信号に基づいて、基質だけでなく阻害物質の定量も可能となる。

【0026】

また、交流電位の中心電位が、電子伝達体の酸化還元電位近傍に設定されていることが好ましく、特に、電子伝達体の酸化還元電位に対して $-0.1 \sim +0.1$ Vの範囲内であることが好ましい。また、交流電位の中心電位が、阻害物質の作用極での反応が拡散律速領域となる電位領域内またはその近傍に設定されていることが好ましく、特に、阻害物質の作用極での反応が拡散律速領域となる電位領域の中で最も負の電位に対して 0.05 V負の電位よりも正の電位であることが好ましい。このようにすると、作用極に印加した電位の変調に対して、電子伝達体由来の電流変化を大きく、かつ阻害物質由来の電流変化がほとんどないようにすることができる。したがって、基質と阻害物質が混合している試料液を用いた交流法による基質測定において、阻害物質による影響をより完全に排除することが可能となる。

【0027】

本発明の基質の定量方法において用いる電気信号は、電気化学反応の進行に伴って変化する電気信号であればよく、例えば、電流、アドミッタンス、インピー

ダンス等が挙げられる。この中では、電気信号がインピーダンスであることが好ましく、電気信号として電流やアドミッタンスを用いる場合には、これらをインピーダンスに変換し、得られたインピーダンスに基づいて基質量を出力することが好ましい。

【0028】

また、電極系がさらに参照極を含むことが好ましい。このようにすると、作用極に印加する電位が安定するので、より安定した基質測定を行うことができる。用いる参照極としては、 Ag/AgCl あるいは飽和カロメル電極（SCE）などを用いることが可能であるが、これらに限定されることはなく、電位の安定した電極であれば他の電極を用いてもよい。

【0029】

本発明の基質の定量方法において用いる作用極としては従来公知のものを特に制限なく用いることができるが、作用極が回転ディスク電極（以下、RDEと略称する）またはマイクロ電極とすることが好ましい。一定速度で回転するRDE、あるいは電極表面への電子伝達体の側方拡散が電気化学反応に寄与する程度に小さい電極面積を有するマイクロ電極を用いると、静止バルク電極を用いた場合と比較して、作用極に印加した電位の変調に対する電子伝達体由来の電流変化をより大きくすることができるため、基質に対する感度をより高くすることができる。また、これらの電極を用いた直流ボルタモグラムにおいて、アノード及びカソード波の間のヒステリシスが非常に小さいことから示唆されるように、本発明による交流法を用いた基質測定を安定に行うことができる。

【0030】

本発明の基質の定量方法において使用される、阻害物質が溶解した試料液としては、基質と阻害物質を溶解した溶液、さらには基質と阻害物質が溶解している生体液、例えば血液、血漿、血清、尿、及び間質液などを用いることができる。また、阻害物質としては、アスコルビン酸（ビタミンC）、尿酸、及びアセトアミノフェンなどが挙げられる。

【0031】

本発明の基質の定量方法において使用される酸化還元酵素は、試料液に溶存す

る測定対象となる基質の種類に応じて適切なものが選択される。例えば測定対象となる基質がグルコースの場合には、酸化還元酵素として、グルコースオキシダーゼ、ピロロキノリンキノン依存型グルコースデヒドロゲナーゼ、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド依存型グルコースデヒドロゲナーゼ及びニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸依存型グルコースデヒドロゲナーゼ等が挙げられ、基質がコレステロールの場合には、コレステロールオキシダーゼ、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド依存型コレステロールデヒドロゲナーゼ及びニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸依存型コレステロールデヒドロゲナーゼ等が挙げられる。また、上記酸化還元酵素以外にも、測定対象となる基質の種類に応じて、例えば、アルコールデヒドロゲナーゼ、乳酸オキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、アシル-CoAオキシダーゼ、ウリカーゼ、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ、フルクトースデヒドロゲナーゼなどを用いることができる。

【0032】

本発明の基質の定量方法において使用される電子伝達体としては、フェロセン誘導体、フェリ／フェロシアン化物イオン、ルテニウムヘキサシアネート、オスミウムートリス（ビピリジニウム）、オスミウムージ（ビピリジニウム）イミダゾリニウムなどの金属錯体、p-ベンゾキノンなどのキノン誘導体、フェナジンメトサルフェートなどのフェナジニウム誘導体、メチレンブルーなどのフェノチアジニウム誘導体、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸などが挙げられる。この中でも、安定性が高く、電子移動反応速度が速い電子伝達体であるフェロセン誘導体、ルテニウムヘキサシアネート、オスミウムートリス（ビピリジニウム）、オスミウムージ（ビピリジニウム）イミダゾリニウムがより好ましい。これら電子伝達体は酸化還元電位が比較的高いため、本発明を実施する上で好適である。さらに、フェリ／フェロシアン化物イオンは安定性が高く、かつ安価であるという点で好ましい。これらの電子伝達体は、ポリマーバックボーンに結合した形態、またはそれ自身の一部もしくは全部がポリマー鎖を形成するような形態であってもよい。また、酸素を電子伝達体として用いることも可能である。電子伝達体は、これらの一種または二

種以上が使用される。

【0033】

【実施例】

以下実施例を用いて本発明を詳しく説明するが、本発明はこれらのみに限定されるものではない。

【0034】

（実施例1）

0.2 mMのフェロセンカルボン酸及び4 μ Mのグルコースオキシダーゼを試薬系として溶解したpH7のリン酸緩衝液10 mLを、Pyrexガラス製の容器に入れて電解液として用い、作用極として直径3 mmの円形白金ディスク、対極には2 cm角の白金板を用いて電気化学セルを構築した。試料液としてアスコルビン酸を溶解したグルコース水溶液を、それぞれの濃度が順に0.5 mM、及び20 mM（約400 mg/dL）となるように添加した。

【0035】

一定時間経過後に、中心電位が対極に対して+0.1 V、振幅0.01 Vの交流電位を、作用極に印加した。この作用極における中心電位は、フェロセンカルボン酸の酸化還元電位に対して-0.1～+0.1 Vの範囲内であり、かつアスコルビン酸の作用極での反応が拡散律速領域となる電位領域の中で最も負の電位（0.18 V（pH7） vs Ag/AgCl）に対して0.05 V負の電位（すなわち0.03 V（pH7） vs Ag/AgCl）よりも正の電位である。交流電位の周波数は20 mHz～10 kHzであり、具体的には20、50、100、200、500 mHz、1、2、5、10、20、50、100、200、500 Hz、1、10 kHzの値を用いた。

【0036】

交流電位の印加からさらに一定時間経過後、インピーダンスZを測定し、複素インピーダンスプロットを行った。上述したように比較的低い周波数においては電流－電位間に位相差がほとんどないため、プロットは実数軸付近に現れ、徐々に周波数を高くしていくと、Zの大きさは減少し、そのプロット群はほぼ円弧を形成した。

【 0 0 3 7 】

次に、上記と同様の電解液の系列を、グルコース濃度を変化させて調製した。アスコルビン酸濃度は 0.5 mM と一定であり、グルコース濃度は 2、3、4、5、10 mM である。これらの電解液を用い、上記と同様にして測定およびプロットを行った。より低いグルコース濃度の電解液を用いるに従い、得られる円弧の直径はグルコース濃度と一定の相関を有しながら、徐々に大きくなった。このような挙動はアスコルビン酸を含まないグルコース水溶液を試料液として用いた場合も同様であった。

【 0 0 3 8 】

したがって、得られた複素インピーダンスプロットにおける円弧の直径の大きさとグルコース濃度とを関係付けた検量線を予め作成しておくことにより、未知の濃度を有するグルコース水溶液について得られた複素インピーダンスプロットの円弧の直径から、アスコルビン酸の影響を受けることなくグルコース水溶液の濃度を求めることができる。また、20 mHz ~ 10 kHz の範囲内における一定の単独の周波数によって上記の交流測定を行い、そのときに得られた Z の大きさ $|Z|$ を用いて、グルコース濃度を見積もることも可能であった。このように、本発明の基質の定量方法を用いることにより、簡易な構成の測定系で、阻害物質による測定誤差を生じることなく、試料液中に含まれる基質を正確に定量することができた。

【 0 0 3 9 】

(実施例 2)

本実施例では、実施例 1 で用いた電気化学セルのかわりに、以下の手順により作成したバイオセンサを用いて実施例 1 と同様の測定を行った。

【 0 0 4 0 】

以下、図 1 及び図 2 を参照して本実施例において用いたバイオセンサの構造を説明する。

【 0 0 4 1 】

図 1 は、本実施例において用いたバイオセンサの試薬系を取り除いた分解斜視図である。ガラス製の電気絶縁性の基板 1 上に、樹脂製の電極パターンマスクを

設置し、金をスパッタリングすることによって作用極 2 及び対極 3 を形成した。
なお、接着層として金とガラスとの間にクロムの層を形成し、両者の間の密着性を高めている。これら作用極 2 及び対極 3 は、それぞれリード 4 及び 5 によって、バイオセンサ外部の測定用端子と電氣的に接続される。

【 0 0 4 2 】

作用極 2 上に、酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系の層を形成した後、基板 1 に、スリット 6 を有するスペーサー 7、及び空気孔 8 を備えたカバー 9 を図 1 の一点鎖線で示すような位置関係をもって接着することにより、バイオセンサが作製される。スペーサー 7 のスリット 6 の部分に試料液供給路が形成される。センサの端部におけるスリット 6 の開放端部は、試料液供給路への試料供給口となる。

【 0 0 4 3 】

図 2 は、本発明によるバイオセンサの縦断面図である。基板 1 上に形成された作用極 2 上に、酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系 1 1 が形成されている。図示の例では、試薬系 1 1 は、作用極 2 及び対極 3 からなる電極系上に形成されている。

【 0 0 4 4 】

図 2 に示す構造のセンサの試料液供給路となるスリット 6 の開放端に試料液を接触させると、試料液は、試料液供給路内へ毛細管現象により導入され、試薬系 1 1 を溶解して酵素反応が進行する。このように、電極系を設けた基板 1 に、スペーサー 7 及びカバー 9 からなるカバー部材を組み合わせて、基板 1 との間に試料供給口から電極系に試料液を導く試料液供給路を形成すると、測定対象となる基質を含む試料液のセンサへの供給量を一定にすることができるので、測定の精度を向上させることができる。

【 0 0 4 5 】

試料液供給路を設けたセンサにおいては、試薬系は供給される試料液に溶解するように、電極系上に限らず試料液供給路内に露出する部分に設ければよい。例えば、カバー 9 における試料液供給路内に露出する部分、基板 1 上における電極系とは接しないが試料液供給路内に露出する部分に設けてもよい。また、試薬系

は、複数に分割して、一つは基板上に、他の一つはカバー部材側に設けてもよい。その際、各分割された層は、必ずしも全ての試薬を含む必要はない。例えば、酸化還元酵素と電子伝達体を別々の層に含ませてもよい。

【0046】

また、対極3または作用極2のうちどちらか一方を、それに対応するリード5または4とともに形成した絶縁性の第2の基板を、カバー9のかわりに用いてもよい。この場合も、基板1、スペーサー7及び第2の基板により試料液供給路が形成されるので、試料液のセンサへの供給量を一定にすることができ、測定 of 精度を向上させることができる。

【0047】

フェロセンカルボン酸及びグルコースオキシダーゼを試薬系11とし、以上のようにして作製したセンサの試料液供給路の開口部、すなわちスペーサー7のスリット6の開放端部に0.5 mMアスコルビン酸を溶解した20 mMグルコース水溶液を試料液として、センサに供給した。一定時間経過後に、中心電位が対極3に対して+0.1 V、振幅0.01 Vの交流電位を、作用極2に印加した。交流電位の周波数は実施例1に記した値と同一とした。さらに一定時間経過後、インピーダンスZを測定し、複素インピーダンスプロットを行った。その結果、実施例1と同様に、比較的低い周波数においては、プロットは実数軸付近に現れ、徐々に周波数を高くしていくと、Zの大きさは減少し、そのプロット群はほぼ円弧を形成した。

【0048】

次に、実施例1に記した電解液と同様、グルコース濃度の異なる電解液の系列を調製し、これらをそれぞれセンサに供給し、上記と同様にして測定およびプロットを行った。より低いグルコース濃度の電解液を用いるに従い、得られる円弧の直径はグルコース濃度と一定の相関を有しながら、徐々に大きくなった。このような挙動はアスコルビン酸を含まないグルコース水溶液を試料液として用いた場合も同様であった。

【0049】

したがって、実施例1と同様の方法によって、得られた複素インピーダンスプ

ロットの円弧の直径から、アスコルビン酸の影響を受けることなくグルコース水溶液の濃度を求めることができた。また、一定の単独の周波数において上記の交流測定を行い、得られた Z の大きさ $|Z|$ を用いて、グルコース濃度を見積もることも可能であった。このように、本発明の基質の定量方法を用いることにより、簡易な構成の測定系で、阻害物質による測定誤差を生じることなく、試料液中に含まれる基質を正確に定量することができた。

【0050】

(実施例3)

本実施例では、実施例1と同じ組成の電解液（グルコース濃度20 mM、アスコルビン酸濃度0.5 mM）及び電気化学セルを用いた。一定時間経過後に、一定の単独の周波数を有する、中心電位が対極を基準にして+0.1 V、振幅0.01 Vの交流電位を、作用極に印加した。一定時間経過後、インピーダンス Z を測定した。次に、対極に対して+0.3 Vの直流電位を、作用極に一定時間印加し、作用極－対極間に流れる直流電流 I' を測定した。

【0051】

実施例1と同様、グルコース濃度の異なる電解液の系列を用い、上記と同様にして測定およびプロットを行った。より低いグルコース濃度の電解液を用いるに従い、実施例1の結果と同様に、得られる Z はグルコース濃度と一定の相関を有し、徐々に大きくなったので、 Z の値を用いてグルコース濃度を見積もることが可能であった。

【0052】

別途、対極に対して+0.3 Vの直流電位を、作用極に一定時間印加し、作用極－対極間に流れる直流電流を測定する方法により、アスコルビン酸非存在下における直流電流 I のグルコース濃度との関係（ $I-G$ ）、及びグルコース非存在下における直流電流 I のアスコルビン酸濃度との関係（ $I-A$ ）を調べた。 $I-G$ 、 $I-A$ は各々、ほぼ良好な比例関係を示すことがわかった。一方、アスコルビン酸が一定濃度存在している場合の直流電流 I とグルコース濃度の関係、及びグルコースが一定濃度存在している場合の直流電流 I とアスコルビン酸濃度の関係は各々、ほぼ良好な線形関係を示すこともわかった。上記測定により得られた

直流電流 I' はグルコース及びアスコルビン酸のそれぞれによりもたらされる電流の総和であると結論付けることができる。

【 0 0 5 3 】

上記したように、交流測定により得た Z の値を用いてグルコース濃度を見積もることが可能であった。このようにして求めたグルコース濃度を $I - G$ に適用すると、上記測定により得た I' のうちグルコースに起因する分の電流を知ることができ、これを差し引くことにより I' のうちアスコルビン酸に起因する分の電流を知ることができる。この電流を $I - A$ に適用することにより、結果としてアスコルビン酸濃度を見積もることが可能であった。

【 0 0 5 4 】

このように、本実施例の基質の定量方法によると、阻害物質の影響を受けない基質の測定とともに阻害物質の定量を行うことができた。直流電流を基にしたグルコース及びアスコルビン酸に対する検量線、すなわち $I - G$ 及び $I - A$ は、測定毎に作成するのではなく、予め得ておけばよい。

【 0 0 5 5 】

なお本実施例では、交流電位を印加して Z を測定するステップを経てから、直流電位を印加して I' を測定するステップを実行したが、ステップを実行する順は逆であってもよい。また、実施例 2 と同様に、バイオセンサを用いても同様の測定を行うことが可能である。

【 0 0 5 6 】

(実施例 4)

本実施例では、電極系に参照極をさらに含む電気化学セルを用いた。電解液、作用極及び対極は実施例 1 と同じものを用い、参照極には銀／塩化銀電極 ($Ag / AgCl$ 電極) を用いて電気化学セルを構築した。試料液としてアスコルビン酸を溶解したグルコース水溶液を、それぞれの濃度が順に 0.5 mM 、及び 20 mM (約 $400\text{ mg} / \text{dL}$) となるように添加した。

【 0 0 5 7 】

一定時間経過後に、中心電位が参照極を基準にして $+0.36\text{ V}$ 、振幅 0.01 V の交流電位を、作用極に印加した。この作用極における中心電位は、フェロ

センカルボン酸の酸化還元電位に対して $-0.1 \sim +0.1$ Vの範囲内であり、かつアスコルビン酸の作用極での反応が拡散律速領域となる電位領域の中で最も負の電位 (0.18 V (pH 7) vs Ag/AgCl) に対して 0.05 V 負の電位 (0.03 V (pH 7) vs Ag/AgCl) よりも正の電位である。交流電位の周波数は実施例 1 で用いた値と同様とした。

【0058】

さらに一定時間経過後に、インピーダンス Z を測定し、複素インピーダンスプロットを行ったところ、実施例 1 と同様に、比較的低い周波数においては、プロットは実数軸上に現れ、徐々に周波数を高くしていくと、 Z の大きさは減少し、そのプロット群はほぼ円弧を形成した。

【0059】

次に、実施例 1 に記した電解液と同様、グルコース濃度の異なる電解液の系列を調製し、これらをそれぞれセンサに供給し、上記と同様にして測定およびプロットを行った。より低いグルコース濃度の電解液を用いるに従い、得られる円弧の直径はグルコース濃度と一定の相関を有しながら、徐々に大きくなった。このような挙動はアスコルビン酸を含まないグルコース水溶液を試料液として用いた場合も同様であった。

【0060】

したがって、実施例 1 と同様の方法によって、得られた複素インピーダンスプロットの円弧の直径から、アスコルビン酸の影響を受けることなくグルコース水溶液の濃度を求めることができた。また、一定の単独の周波数において上記の交流測定を行い、得られた Z の大きさ $|Z|$ を用いて、グルコース濃度を見積もることも可能であった。

【0061】

また、参照極の使用により、作用極の電位がより安定して変移するため、得られる Z の値は、実施例 1 及び 2 の場合と比較してより安定した。このように、本実施例の基質の定量方法により、阻害物質の影響を受けない基質の測定をより安定して行うことが可能であった。

【0062】

また、実施例 2 と同様にしてセンサを作製し、センサにアスコルビン酸とグルコースを含む試料液を供給した直後に、塩化カリウムと寒天からなる塩橋を介して、銀／塩化銀電極を試料供給口付近の試料液と接触させた。作用極に印加した中心電位が参照極に対して 0.36 V、振幅 0.01 V の交流電位であることを除き、実施例 2 と同様にして交流測定を行うと、実施例 2 において前述した結果とほぼ同様の結果が得られた。ただし、得られる Z の値はより安定した。したがって、本実施例の基質の定量方法により、センサと共に参照極を使用した場合であっても、阻害物質の影響を受けない基質の測定をより安定に行うことが可能であった。

【0063】

なお本実施例では、塩橋を介して、銀／塩化銀電極を試料供給口付近の試料液と接触させたが、銀／塩化銀電極をセンサ基板上にスクリーン印刷によって作製して使用しても同様の効果を得ることができる。

【0064】

(実施例 5)

本実施例においては、作用極を白金製の回転ディスク電極 (RDE) とした点以外は実施例 1 と同じ電気化学セルを用い、実施例 1 と同じ試料液及び測定条件を用いて測定を行った。

【0065】

その結果、実質的には実施例 1 とほぼ同様の結果が得られたが、実施例 1 の結果と比較すると、円弧の直径は減少した。これは、RDE を用いると、静止電極を用いた場合と比較して、作用極に印加した電位の変調に対する電子伝達体由来の電流変化が大きくなるためである。

【0066】

次に、実施例 1 に記した電解液と同様、グルコース濃度の異なる電解液の系列を調製し、これらをそれぞれセンサに供給し、上記と同様にして測定およびプロットを行った。より低いグルコース濃度の電解液を用いるに従い、得られる円弧の直径はグルコース濃度と一定の相関を有しながら、徐々に大きくなった。このような挙動はアスコルビン酸を含まないグルコース水溶液を試料液として用いた

場合と同様であった。静止電極のかわりに R D E を用いても、電位変調に対する阻害物質由来の電流変化の大きさに対してはほとんど影響はみられなかった。

【 0 0 6 7 】

したがって、この直径の大きさより、グルコース濃度を測定することが可能であった。特筆すべきことに、グルコース濃度の変化に対する Z の値の変化は実施例 1 で得られた結果よりも大きいものであり、Z の値もより安定であった。また、一定の単独の周波数において交流測定を行い、得られた Z によってグルコース濃度を見積もることもまた可能であった。このような、R D E を用いることによる効果は、静止電極を用い、試薬系及び試料液を含む液を定常的に攪拌することによっても同様に得ることができる。

【 0 0 6 8 】

また、電極表面への電子伝達体の側方拡散が電気化学反応に寄与する程度に小さい電極面積を有するマイクロ電極を R D E のかわりに用いて、本実施例と同様の測定を行った場合においても、ほぼ同様の結果が得られた。このようなマイクロ電極の使用は、実施例 2 のようにバイオセンサを用いて測定を行う場合にも特に好適である。

【 0 0 6 9 】

以上のように、本発明の基質の定量方法において、R D E あるいはマイクロ電極を作用極として用いることによって、安定かつ感度の高い基質測定が可能であった。

【 0 0 7 0 】

なお、以上の実施例では、作用極に印加する交流電位の中心電位を、対極を基準にして + 0. 1 V、または参照極を基準にして + 0. 3 6 V としたが、この値に限定されることはなく、電子伝達体の酸化還元電位付近であればよく、用いる電子伝達体の種類に応じて好適な値が選択されうる。参照極を用いるか否かによってもこの値は変化し、好ましい値が選択される。

【 0 0 7 1 】

また、以上の実施例では、電位の振幅を 0. 0 1 V としたが、この値に限定されることはなく、実質的に交流測定を行えるような振幅であれば良い。使用でき

る振幅の値は測定装置の性能により決定されるが、好ましくは1～50 mVである。

【0072】

交流電位の周波数については、以上の実施例において20 mHz～10 kHzとしたが、これらの値及び範囲に限定されるものではない。単独あるいは異なるいくつかの周波数だけを用いてもよく、また、その値に限定はない。交流法により得られる電気信号が基質濃度に応じて有意に変化する周波数であればよい。

【0073】

以上の実施例で用いた直流電位は、対極を基準にして+0.3 Vとしたが、この値に限定されることはなく、電子伝達体及び阻害物質が十分に酸化（あるいは還元）される電位であればよく、かつ用いる電子伝達体の種類に応じて好適な値が選択されうる。また、参照極を用いる場合にはその種類によっても変化し得、対応する好適な値が選択される。

【0074】

また、直流電位の印加によって得る電気信号は、以上の実施例で記した直流電流に限定されるものではない。例えば、作用極における通電電荷量であってもよい。

【0075】

以上の実施例において用いた、反応のための一定時間は、本発明を実施するにあたって、観測可能な大きさの出力をほぼ安定に得ることのできる時間であればよい。

【0076】

電極の材料として、以上の実施例においては、白金あるいは金を用いたが、これに限定されることはない。他の材料を用いた電極の例として、パラジウム及びカーボンの電極が挙げられる。さらには白金、金、パラジウム、及びカーボンのいずれかを主たる材料とする混合材料の電極を用いることも可能である。また、以上の実施例においては、作用極と対極を同一の材料を用いた電極としたが、それぞれが別の材料によって作製された電極であってもよい。

【0077】

以上の実施例においては、バイオセンサにおける電極及びそれらのパターンの作製方法としてマスクを通したスパッタリング法を用いたが、これに限定されず、例えば、スパッタリング法、イオンプレーティング法、蒸着法、化学蒸着法のいずれかで作製した金属膜をフォトリソグラフィ及びエッチングと組み合わせてパターン作製をしてもよい。パターン形成はレーザーによる金属のトリミングによっても行うことができる。金属ペーストを用いて基板にスクリーン印刷を施し、電極パターンを形成してもよい。さらには、パターン化した金属箔をそのまま絶縁性基板上に接着させてもよい。電極の材料がカーボンを主とする物質である場合には、基板にスクリーン印刷を施し、電極パターンを形成することができる。

【 0 0 7 8 】

これら電極系の形状、配置、個数、大きさ等は以上の実施例に示したものに限定されるものではない。例えば、作用極と対極をそれぞれ異なる絶縁性基板上に形成させてもよいし、作用極と対極をそれぞれ複数個形成させてもよい。形状はくし型であってもよい。また、リード及び端子の形状、配置、個数、大きさ等も上記実施例に示したものに限定されるものではない。

【 0 0 7 9 】

RDEの回転速度に限定はない。またマイクロ電極の電極面積は、電極表面への電子伝達体の側方拡散が電気化学反応に寄与する大きさの範囲内であればよい。

【 0 0 8 0 】

試料液中の基質及び阻害物質の濃度は以上の実施例に記した値に特に限定されない。試料液の量についても限定はない。

【 0 0 8 1 】

試薬系に含まれる各試薬の量あるいは濃度は、以上の実施例に記した値に限定されない。酵素反応及び電気化学反応が十分に進行する量であればよい。

【 0 0 8 2 】

以上の実施例における試薬系全体または試薬系に含まれる試薬のうち一つあるいは複数を作用極に固定化することによって、酵素、電子伝達体を不溶化または

非溶出化させてもよい。固定化する場合は、共有結合法、架橋固定法または配位結合や特異的結合性の相互作用を用いた固定化法を用いることが好ましい。あるいは、酵素、電子伝達体を高分子物質によって包摂し、擬似的な固定化状態を与える方法もまた、容易な試薬系形成法として有効である。用いられる高分子は、疎水的であっても親水的であってもよいが、後者がより好ましい。例えば、親水性の高分子の例として、水溶性セルロース誘導体であるカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、エチルセルロースなど、あるいはポリビニルアルコール、ゼラチン、ポリアクリル酸、デンプンとその誘導体、無水マレイン酸重合体、メタクリレート誘導体などが挙げられる。

【 0 0 8 3 】

また、以上の実施例における試薬系に pH 緩衝剤を含ませることがより好ましい。これにより、反応液の pH を酵素活性に適した値に調整し、測定時に酵素を効率よく機能させることができる。さらには、阻害物質の多くはプロトンが関与する電気化学反応をするので、その阻害反応が拡散律速となる電位領域は電解液の pH によって変化するが、pH 緩衝剤を用いることにより、その電位領域を一定の値に固定することが可能となる。したがって、本発明による阻害物質の影響の排除をより安定に行うことができる。pH 緩衝剤としては、例えば、リン酸塩、酢酸塩、ホウ酸塩、クエン酸塩、フタル酸塩、またはグリシンのうち、一種または複数を含む緩衝剤を用いることができる。また、上記塩の水素塩の一種あるいは複数を用いてもよい。また、いわゆる「グッドの緩衝液」に用いられる試薬を用いてもよい。これらの pH 緩衝剤がセンサ系内に含まれる場合の形態は、センサの構造によって変化するものであり、例えば固体であっても溶液であってもよい。

【 0 0 8 4 】

以上の実施例に述べたバイオセンサにおいては、測定対象となる基質を含む溶液の量を容易に一定に規定することにより測定精度を向上させることができるため、スパーサーが上記バイオセンサの構成要素として含まれていることが好ましい。しかし、一定体積の試料を採取することのできる器具と合わせて本発明で述べたバイオセンサを用いる場合には、スパーサー及びカバーからなるカバー部材

は必ずしも必要ではない。

【 0 0 8 5 】

【発明の効果】

以上のように本発明によれば、簡易な構成の測定系により、阻害物質による測定誤差を生じることなく、試料液中に含まれる基質を正確に定量することが可能な方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の一実施例において用いたバイオセンサの試薬系を除いた斜視図

【図 2】

同バイオセンサの要部の縦断面図

【図 3】

従来の方法において、 GOx 、電子伝達体及びグルコースが溶解した溶液、並びに阻害物質の溶液について得られる、電極電位と電流の関係を示す図

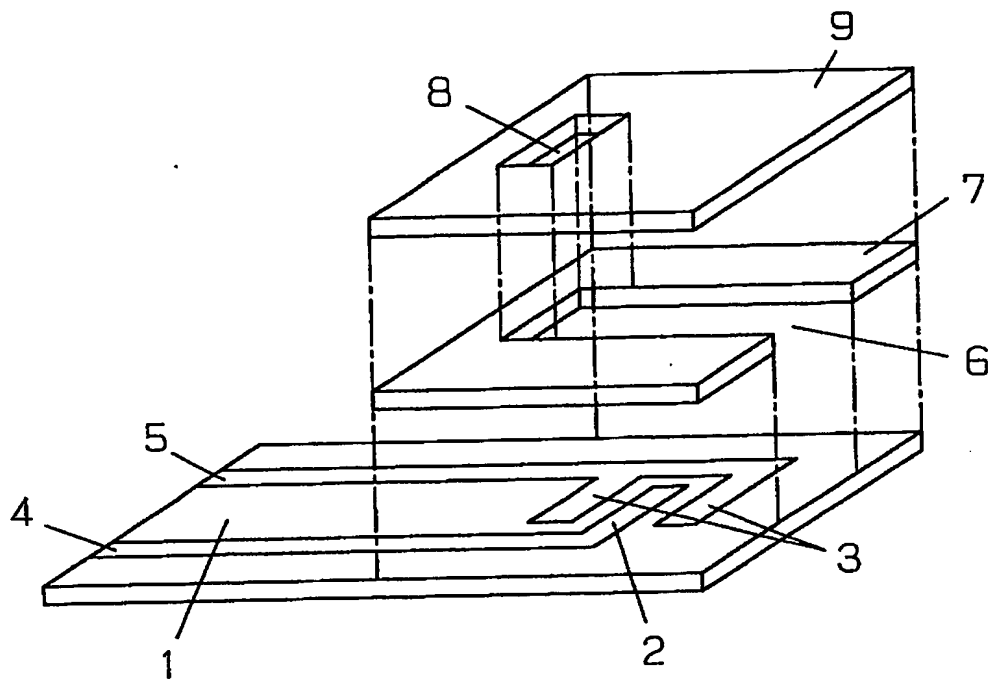
【符号の説明】

- 1 基板
- 2 作用極
- 3 対極
- 4, 5 リード
- 6 スリット
- 7 スペーサー
- 8 空気孔
- 9 カバー
- 11 試薬系

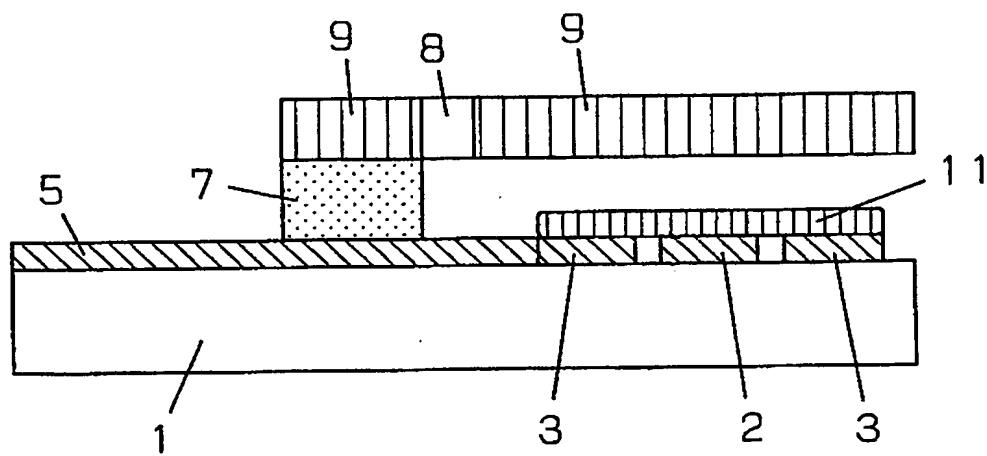
【書類名】

図面

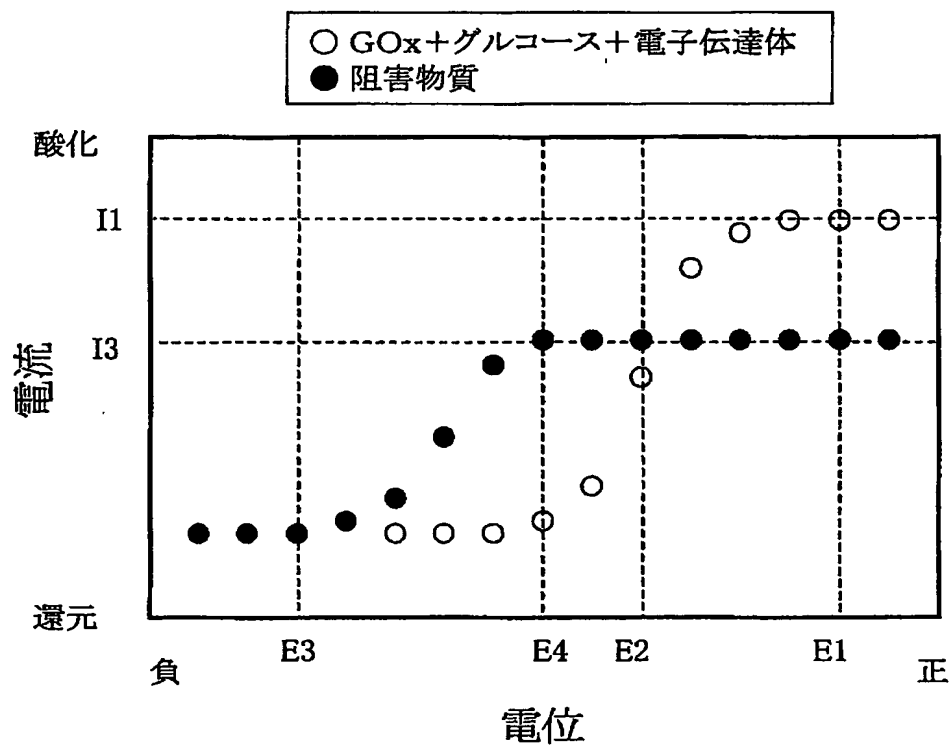
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 簡易な構成の測定系により、阻害物質による測定誤差を生じることなく、試料液中に含まれる基質を正確に定量することができる方法を提供する。

【解決手段】 作用極及び対極を含む電極系、並びに酸化還元酵素及び電子伝達体を含む試薬系を用い、阻害物質が溶解した試料液中に含まれている基質を定量する方法であって、試薬系の存在下で電極系に試料液を供給する工程A、作用極に交流電位を印加し、電子伝達体の酸化還元反応を生じさせる工程B、電子伝達体の酸化還元反応に基づいて生じた電気信号を電極系により測定する工程C、及び電気信号に基づいて試料液中に含まれる基質を定量する工程Dを含む方法。

【選択図】 図1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005821]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府門真市大字門真1006番地

氏 名 松下電器産業株式会社